

INJECTABLE OPACIFYING LIPOSOME COMPOSITION

Publication number: JP2500192T

Publication date: 1990-01-25

Inventor:

Applicant:

Classification:

- International: A61K9/127; A61K49/04; A61K9/127; A61K49/04;
(IPC1-7); A61K9/127; A61K49/04

- European: A61K49/04H8F2

Application number: JP19880504697 19880516

Priority number(s): CH19870001991 19870522

Also published as:

WO6809165 (A1)
EP0314764 (A1)
US5312615 (A1)
ES2009017 (A6)
EP0314764 (A0)

more >>

Report a data error here

Abstract not available for JP2500192T

Abstract of corresponding document: WO8809165

Injectable aqueous composition intended for opacifying certain organs with a view to examination by X-rays. This composition is based on liposomes containing, encapsulated therein, an aqueous solution of an iodinated opacifying agent. The ratio between the weight of iodine encapsulated by the liposomes and the weight of the lipids from which their membrane is formed is not lower than 1.5 mg/mg.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

特設平2-500192 (4)

[illegible]

さらに、ヨウ素化された不透明剤の存在は、結晶液の飽和度を引上げることに寄与し(例えば、1 g ヲリヨール 30 g のオパールモデルの水溶液は、20°C で 8.8 wt%、および 37°C で 4.7 wt% の結晶を有する)、そしてミセルの分散初期中の結ヨウ素化された化合物の量のどのような減少でもこの結晶を低下せしめる一因となるであろう。

本実験に供する炭素のフィソソームの調製方法は、フィソソームを炭素の遊離粒子において通常に従われる調製法性の化合物から精製されてもよい。そのような化合物は、前述の引用文献中に記載されている。フィソ脂質、例へば大豆の加水分解されたレシチン（例へば、Nottermann *Chemie* の PC-256 製法）、ジブチルトリオキスホスファトリルジメチル（DPP）、ジステア

[illegible]

X 類に対して不透明であるよう加工された有機性化合物として、前述の技術文献から知られる化合物のほとんどとを利用することが可能である；しかしながら、ある不透明剤は、リボソーム小胞へのそれらの水性液の封入容器および箱中の既小胞の水性液の両方で極小のもよりなる。従って、極微細の不透明剤の選択は、リボソームの形成と発現の両者のより好ましいために、そしてさらに、それらの狭つたは他のものよりも便宜または取扱い時にリボソーム膜の外側に拡散しやすい。

この項で、不溶剤として、トリヨード安息香酸から誘導されるイオン性の遮影剤、例えばジアトリゾイン酸のナトリウム塩および／またはノズルミン塩、および得宜しくは即

イオン性膨潤剤、弱塩基性固定の別として考えられるイオン交換樹脂またはイオンブローラーを使用するのが好ましい。該膨潤剤は、100〜450gのヨウ素¹、好ましくは250〜280g¹の1gの強度を有する塩酸の形で扱われる。そのような塩酸。および本発明に係る生成物を使って、6gのヨウ素/gの樹脂に浸けおろす封入されたヨウ素量が見られる。

一般に、本発明の組成物を調製すると、リボソーム小胞により占有される体積は懸濁液全体積の約5〜80%を占め、そしてある特別な場合にはそれらの数量を超えるかもしれない(70-80%まで)。

小糸田に橋を架け成産を奨励するため、明治45年小糸の村小針堂を海抜35mの所に、そして例へば、ガソリン【この小針堂は35mの所の埋み深さ(1)×1.5】より多いの不飽和性炭化水素を封入する力をもつシリゲル質の土の透水性低減を促進するものな法は、其後の小針の土質を確保すること、即ち埋められた斜面にもパイプが倉庫にある小針の「透水性低減」を達成し、その後の土を排除すること、またはその表面より土を掘り出すこと、選ばれた範囲に当たる直径を有する長い小針に充填することである。ガソリンの土質の標準化に関して「無害な部分」という方向により、昭和54年以降にはその土質の存在および土質の劣化を適宜に封じられるべき部分と汚染の範囲を決定する。【CANDLER Nano-Slice®技術 (高圧溶接)】を採りながらの建設は、劣化を劣化【ELECTRONIC LTD. Great

Britaine を参照のこと)。P 値のスケールは、0~10 の範囲である。1 の値は単分散の粒子に相当する。例えば、8 の値は、最大と最小の粒子の分散の比が約 4 であることを示す。

また、粒子の分布曲線の形状が W を計算することを可能にする。従って、即ちそれらから大部分のサイズの分布は、 $W = W_{\text{mid}}$ (ここで W_{mid} は図 10 に示すようにある一定の粒子のサイズである) の関係に従って、250nm より大きい粒子については W で、そして 100 ~ 250nm の粒子については W_{mid} で P を算出することにより与えられる。氷点降下においては、多数粒状の氷を凍結させると相反し、そして 4 に等しいかまたはそれより小さい P の値については粒子の大部分が固定されたサイズに相当するとみなされる。

使って、請求項に比対しめられた方法は、請求項に定
義されたような組換えの到達するための手段を説明してい
る。小図の大部分が約0.15×3mm、特に2〜3mmのサイズを有し、
特に高い割合で歪みを生ずるというところから実質に判断さ
れた。「大部分」という言い方により、少なくとも70%の限
りポリマー小図が歪みられた範囲に適合する直往を有する
という事実を示さないという。

この範囲内に含まれるリポソーム小胞が有数個のような高い容量を統合する能力があるかの正確な理由は明らかになっていないが、次のような結論を提出することができる。第一に、この境界より下りのリポソームは不適合な脂質／面積の比を有し（実際、単位が減少すればするほど、この比は小さくなる）、そして第二に、約2 μ mを超える微小細胞はしばしば

特許平2-500192(5)

層膜状(membranous)であり、そして知能として与えられた容積に対するそれらの膜の分子蓋が大きい。正確に寸法調節された膜を通して押出により、多層膜状のリゾソームが少なくとも部分的に、単層膜 (monolamellar) の膜を有する小さいリゾソームに再配列される；これらの「再配列された」リゾソームの一部は、本発明に係る膜形成に基ずる最適条件下に相違する。

一般に、リゾソームの形成の標準法は、圧力下で透過膜を押し通すことにより行われる。この「押し出し」に利用される圧力は、1 bar と数 bar の少ない間で異なるであろう。例えば、約 0.4 ~ 2 bar の圧力を有する膜については、0.5 ~ 1.0 bar の押し出し圧力を使う。この方法で、1 ~ 2.0 ml/sec のオーダーの透過速度を確立することができる。水相分散相が断地的な割合で不適切な割合に、押し出し過程に依り 1/1 位の増加がもたらされることは知られて理解されることである。もしこの割合がより低くない場合、低小粒の外部の細の内面への透過により封入された膜の制御をもちたことが不可能であることは明らかである。

押し出し装置が低小粒中に封入される脂質の不透明膜の形成と関連して役割を果たすことは知られている。従って、もし押し出しを通常速度で行うならば、1/1 位のいくらかの減少を止むことが可能である。逆に、そして付加的な予期しない要求を考慮して、リゾソームを形成するリン脂質の総量よりも高い速度で実行する場合、この比が増加が観察される。例えば、50 ~ 90%、例えば 75% の品

度を従う。

膜形成中に含まれる封入されていないリウムの濃度、即ちリポソームが懸濁されている基質溶液中に溶解された不透明膜の割合を試験させるために、脂質または膜形成物が有るに依り、この方法は低小粒と溶解した水相との間の物理性分離を引き起こす。この分離は達成されることなく、低小粒を新しい水相分散相に再分散せしめる。この操作を繰り返すことにより、リポソームの良化 (含液で溢れない) が短縮になるように、分割の要素中の不透明膜の割合を、選んだ量、例えば 2 ml/ml または 0.2 ml/ml のオーダーにさらに減少させることができる。一般に、そのような最適条件は数千の g、例えば 10,000 ~ 250,000 g の確かな加速で行われる。空筒の技術に依りマイクロレンジーションまたは透析によっても、そのような結果を得ることが出来る。始められた溶解された孔は、例えば 1 ml またはそれより大きい孔 (前述のマイクロレンジーションの機会には、その孔の孔は 1 μm より小さい) を有する空のチューブのヘッドで、照準すべき膜形成物を密封せしめることにより、マイクロレンジーション操作を行うことができる。該マイクロレンジーションを要した膜形成物の厚が減少する (該チューブの孔を這るこの管形成の通過により) につれて、新しい脂質、例えば脂質化化合物または脂質製上液置される水溶液により置換される。これらの脂質を要して、分割装置中に含まれる置換しない物質、特に溶解されたリウムの大部分が除去される。さらに、マイクロレンジーションは減速に依

いて、幾つもの速ましくない脂質、特にごく小さい脂質水相を脂質を脂質とすることを可能にし、これは、1/1 比の改善の結果を有する。

リポソームの外部の膜形成を確立する装置として、親水性の液体および脂質層膜の割合すなわち脂質を量ることが可能である。そのような装置の例として与えられるのは、トリス、リン緩衝液で緩衝化されているかまたは緩衝化されていない、塩溶液、水溶液 (中性領域の pH)、および塩、グルコース、不適切膜、脂質物等から選ばれた 1 つまたは複数の物質を含む緩衝液である。1 つの典型的な緩衝液 (0.5 mM) は、グルコース (0.7 M)、HCl (0.5%) およびトリス (10 mM) を含有する。

本発明において膜形成物として使用されるリポソーム膜形成の経験のために、最初の技術、特に特に引用した文献中に記載されているものを利用することが出来る。

好ましい利用されるのは、R 及び B 法 (cf. F. Sponka 等、(1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 4194) および B 法 (1979, 669) の両方の中に記載されているものである。

これらの方法の適用により、一般に次のパラメータを有するリポソームの最初の膜形成が得られる： 脂質濃度 0.5% NaCl, 10 mM Tris, pH 7.5；

- 脂質、約 1%；
- 全油相濃度、20 ~ 50 ml/ml；
- リポソーム内のリウムの濃度、1 ~ 3 g/g 脂質 (200 g の 4 のイソオクトール溶液)。

そのような最初の膜形成に前述の操作を行うことにより、本発明に係る不透明膜が得られる。

実験段階への導入による不適切なものでその割合の物に、本発明の形成物はその特定の脂質および透過性のために、非常に好都合であることが示される。特に、前におけるリウムの保持の 50 ~ 60% の減少が観察される。脂質濃度がより少ないリウムの量を要する本発明の膜形成を用いて、リウムの全体濃度がリポソームの脂質濃度の 0.5 重量比に達するであろう従来法 (例えば、0.5 ~ 4.1, 192, 850 重量比) による膜形成を用いて得られるものと等量またはより優れた膜形成物を得ることが出来る。

次の実験段階が本発明を具体的に説明する。

例 1

最初に、クロロホルム 4.2 ml/ml に α -トリスノールホスファチル酸 (BPA, PLURON) 5.7 mg および α -トリスノールホスファチルコリン (DPPC, PLURON) 54 mg を含む溶液を調製する。この溶液 2.0 ml にクロロホルム 2.0 ml および α -トリスノールホスファチル 4.0 ml を加え、攪いで溶解した後、7.5% (g/v) の α -トリスノールホスファチルコリンを添加し 2.0 ml、即ち 100 重量比に達する不透明膜 (BPA/CO) を加える。5.0 秒に加熱し得られたその脂質物を、塩溶液 (Bran Lysine 1510) に 5 分間攪拌した。次にそのエマルジョン、グルが得られるまでロータリーエバポレーターで 45 分間に渡り減圧した。そのプロセスに 7.5% α -トリスノールホスファチル 2.0 ml および α -トリスノール 4.0 ml の混合液を加え、そして攪拌しは

計表平2-500192 (6)

から吸出を繰り返した。均一混合液を得た後、そこに7.5%メグルミンジアトリゾネート水溶液約2.0mlおよび高濃度8.0mlの産物を再び添加し、そして吸出の最後の産物を溶液により取り除いた。得られたリボソームの溶液（培養液）の体積を蒸留水により4.0mlに調整した。

リボソーム内部に効果的に封入されたメグルミンジアトリゾネートの量を決定した。得られた類似物（5ml）を23.0, 0.01gと2.5%調整された。その小量で1.0mlの塩析液（0.5% NaCl, 16mM Tris-HCl, pH7.2）中に取り出し、そして2倍量の塩析液（15分、26.00mg）を行った。この過程に続く（厚膜液）中の取出しの段階をさらに4回繰り返した。これは封入されなかったメグルミンジアトリゾネートの完全な除去を可能にする。最後の5分中の塩析の後、得られた塩析液のアリコート（0.5ml）を、リブソーム塩析ナトリウム（0.1%）の溶液0.1mlに添加し、そして4.0分は5分間加熱した。この溶液の200nmでの光学密度を測定することにより、この段階で、高濃度製剤が60%（10.4mg）のナトリウムに相当する21.4mg/mlのメグルミンジアトリゾネートを含有することを確認された。高濃度のロスを排除することにより、この高濃度が7.14mg/mlのナトリウム、または1.15%のナトリウム濃度を有するであろうことが証明される。

最終Aの吸取りを75℃に加熱し、次いで1.5%の孔徑を有するポリカボネート膜（Fuculapero）を通して熱処理において排出した。次いで得られた高濃度を調整密度まで冷却し、そしてその後、減圧のようである一定の速度に続く（高濃

度）中の取出しを行った。5回の洗浄液に得られた高濃度の分光光度分析は、0.2mg/mlより低い外液液中の残存の濃度を示した。この時点で、リボソームの懸液を全長7mlの塩析液中に懸濁した。最終高濃度の全々の濃度を決定するために、この高濃度のアリコート量と、前述のようにリブソーム塩析ナトリウムの存在下4.0分と5分間インキュベートした。分光光度分析は、最終高濃度が、60%（10.4mg/ml）の濃度に相当し、そして1.75%（1/1）比を有する。12.5mg/mlのメグルミンジアトリゾネートを含有することを示した。従って、高濃度溶液は、封入されたナトリウムの2%の増加をもたらした。

例3

リブソームナトリウム 100mlは、前述したといて次の物質：BPPC3/BPPA1/BSPC1を含むリブソームの産物（この高濃度は7.1mg/mlの濃度（重量）でナトリウム中に懸濁されている）100mlを添加した。

次いでそこにイソオキドール（0.1%）2.5%溶液（60%の濃度）3.0mlを添加し、そして全体を超音波を使って5.0分と5分間高濃度を処理した（BPPC3/BPPA1/BSPC1 15000回転）。高濃度の溶液を除去するため、Fotavaporo（45°/30mg）を使って熱状態を調整した。高濃度されたナトリウムをイソオキドール溶液100ml中に再び分配させた。次いでこの高濃度の試料を、約5barの圧力下で0.5mm、1mmまたは2mmの膜（Fuculapero）を通してナトリウムを行った。様々な排出された高濃度又は高濃度高濃度を高濃度

(235.000g/20分)し、その後、既知リボソーム小胞を高濃度（0.9% NaCl, 16mM Tris, pH7.2）中に再分配させた（テスト1および2）。溶液によれば、分級液として、イソオキドールに対して等量の溶液、即ち0.7%のグルコース、16mM NaCl, 16mM Tris のものを使った（テスト3）。この高濃度（分級液中に高濃度されているナトリウムの除去）を、これらの高濃度の1つまたは他のものを換えて、ある高濃度にした。高濃度を20.000gと1.5分間けい、0.2mg/ml以下の分級液の残存の濃度を減らす。この高濃度は200nmでの分光光度により測定された。一般に、4またはそれより少ない濃度および高濃度の工程の数が、所望の高濃度を達成するのに十分である。

この時点で、例1に記載したようにして、リブソーム塩析ナトリウム（60%）でのアリコート量の範囲により、封入されたナトリウムの量を決定した。0.1mlの0.1%高濃度3.0mlを0.5%のリボソームの溶液に加えた。そしてその混合物を4.0分と5分間加熱し、次いで分光光度の読みを行う（外液は封入されたナトリウムを有さない同等の試料である）。1.5%のナトリウム/高濃度に相当する高濃度。200nmで0.604である。高濃度ナトリウム（COLTHER Monoclonal）により、リボソームの小胞を平均サイズおよびその多分散度を算出した。

その結果を下に示す。テスト1および2は高濃度中の高濃度の試料に同じ（テスト3はグルコース溶液中の高濃度に相当する）。

テスト	膜の孔徑 (μm)	小胞の平均 サイズ (nm)	分級液	封入されたナトリウム (g/g 高濃度)
1	膜の孔徑	610	5	2.28
1A	2.0	555	5	1.19
2	最初の試料	602	5	3.02
2A	1.0	492	4	3.75
2B	0.5	488	3	3.84
2C	0.3 (4回排出)	246	3	2.75
3	最初の試料	519	5	2.31
3A	周囲密度*	708	3	3.12
3B	2.0 2.5	883	3	2.95

* このテストでは、排出した75℃の代わりに周囲密度で行った。

この高濃度の結果は、一部の排出した高濃度が封入された高濃度の濃度における有する増加および多分散度高濃度の減少を強く示している。加えて、高濃度の孔の大きさが減少すると、封入されたナトリウムの1/1比（および小胞の寸法の均質性の低下）が得られる。

例のテストにおいて、封入されたナトリウムの量を約6.0%（高濃度）で増加させることが可能であった。

例3

B. SPNUTUS (Intera, J. Pharmaceutica (1991) 25, 200) に従って、ナトリウム（12ml）中に540mgのナトリウムとナトリウム

